



Octrooiraad  
Nederland

(11) Publikatienummer: 9101359

(19)

## (12) A TERINZAGELEGGING

(21) Aanvraagnummer: 9101359

(22) Indieningsdatum: 07.08.91

(51) Int.Cl.<sup>5</sup>:  
**A61K 39/02, A61K 39/095,  
C07K 17/10, C08B 37/00,  
C08H 1/00**

(43) Ter inzage gelegd:  
01.03.93 I.E. 93/05

(71) Aanvraager(s):  
**De Staat der Nederlanden, vertegenwoordigd  
door de Minister van Welzijn, Volksgezondheid  
en Cultuur te Rijswijk**

(72) Uitvinder(s):  
**Peter Hoogerhout te Bilthoven. Jan Theunis  
Poolman te Broek in Waterland. Emmanuel  
Jacques Henri Wiertz te Utrecht. Prof. Dr.  
Jacques Hubertus van Boom te Voorschoten.  
Gysbert Arie van de Marel te Leiden. Gerardus  
Josephus Petrus Boons te 's-Gravenhage**

(74) Gemachtigde:  
**Ir. L.C. de Bruijn c.s.  
Nederlandsch Octrooibureau  
Scheveningseweg 82  
2517 KZ 's-Gravenhage**

(54) **Nieuw saccharide-peptide-conjugaat, werkwijze ter bereiding ervan alsmede een vaccin dat een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat omvat**

(57) De uitvinding heeft betrekking op een saccharide-peptide-conjugaat waarvan het saccharidegedeel een oligosaccharide deel (core region) van een lipopolysaccharide van een gramnegatieve bacterie of een van een oligosaccharide deel afgeleid fragment als immuniteit verlenend B-cel activerend deel met ten minste één epitool omvat en het peptidedeel ten minste een homoloog eiwit of een van een homoloog eiwit afgeleid peptidefragment met een T-helpercel activerend deel met ten minste één epitool omvat, (waarbij homoloog wil zeggen dat het B-cel activerende deel en het T-helpercel activerende deel in hetzelfde micro-organisme voorkomen).  
De uitvinding heeft tevens betrekking op een werkwijze ter bereiding van een saccharide-peptide-conjugaat zoals hiervoor beschreven is alsmede op een vaccin dat een werkzame hoeveelheid van een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat omvat.

NLA 9101359

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

Nieuw saccharide-peptide-conjugaat, werkwijze ter bereiding ervan alsmede een vaccin dat een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat omvat.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een saccharide-peptide-conjugaat waarvan het saccharidegedeel ten minste een van een lipopolysaccharide (LPS) van een gramnegatieve bacterie afgeleid immuniteit verlenend B-cel activerend deel met ten minste één epitoot omvat en het peptidedeedel ten minste een homoloog eiwit of een van een homoloog eiwit afgeleid peptide-fragment met een T-helpercel activerend deel met ten minste één epitoot omvat, (waarbij homoloog wil zeggen dat het B-cel activerende deel en het T-helpercel activerende deel in hetzelfde micro-organisme voorkomen). De uitvinding heeft eveneens betrekking op een vaccin dat een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat omvat en op een werkwijze ter bereiding van een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat.

Het is bekend dat vaccins van gezuiverde kapselpolysacchariden (CPS) beschermende immuniteit kunnen induceren. Deze immuniteit is afhankelijk van de leeftijd van de ingeënte persoon en is slechts van korte duur. De intrinsieke nadelen van kapselpolysacchariden als vaccins worden omzeild door de klassieke benadering kapselpolysacchariden of daarvan afgeleide oligosacchariden te koppelen met eiwitten (Goebel, W.F., en O.T. Avery 1929 J. Exp. Med. 50:533-550 en Cruse, J.M. en R.E. Lewis (Erd.) 1989 Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Krager, 10:1-196). Het koppelen van polysacchariden aan eiwitten heeft tot gevolg dat het karakter van dit type antigeen verandert van thymus onafhankelijk in thymus afhankelijk. Dergelijke poly- of oligosaccharide-eiwitconjugaten zijn in het algemeen zeer immunogeen bij jonge kinderen en kunnen geheugen induceren.

Hier volgen een aantal voorbeelden van bekende saccharide-peptide-conjugaten:

Uit de Nederlandse octrooiaanvraag 86.023.25 zijn conjugaten van kapselpolysacchariden (CPS) van H. influenza b met tetanustoxoïde (TT) bekend.

Er zijn conjugaten bereid van kapselpolysacchariden van meningococcus groep A en C met tetanustoxoïde, welke conjugaten bij muizen en konijnen zeer immunogeen blijken te zijn ([Beuvery, E.C., A. Kaaden. V. Kanhai, en A.B. Leussink. 1983. Physicochemical and immunological characterization of meningococcal group A and C polysaccharide-tetanus toxoid conjugates prepared by two methods. Vaccine 1:31-36], [Beuvery, E.C., F Miedema, R van Delft en K. Haverkamp. 1983. Preparation and immunochemical characterization of meningococcal group C polysaccharide-tetanus

toxoid conjugates as a new generation of vaccines. Infect. Immun. 40:39-45] en [Jennings, H.J. en H.C. Lugowski. 1981. Immunochemistry of groups A, B and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. J. Immunol. 127:1011-1018]).

5 Voor de groep B meningococcus is gezocht naar andere saccharide-peptide-conjugaten die bruikbaar kunnen zijn in een vaccin, aangezien kapselpolysacchariden van deze groep grammnegatieve bacteriën geen immuunreactie geven. Hiertoe zijn saccharide-peptide-conjugaten gemaakt met gemodificeerd kapselpolysaccharide en dragereiwitten ([Jennings, H.J., R. 10 Roy, en A. Gamian. 1986. Induction of meningococcus group B polysaccharide-specific IgG antibodies in mice using an N-proprionylated B polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. J. Immunol. 137:1708-1713] en [Jennings, H.J. 1989. The capsular polysaccharide of group B Neisseria meningitidis as a vehicle for vaccine development. In Cruse, J. 15 M., and R. E. Lewis, Conjugate Vaccines. Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Krager. 10:151-165]).

Men vermoedt echter dat anti groep B antilichamen (in het bijzonder IgG) in vivo kruisreactie vertonen met gastheerantigenen en dientengevolge zou het gebruik van een saccharide-peptide-conjugaat dat gemodificeerd 20 kapselpolysaccharide van groep B meningococcus omvat de oorzaak van autoimmuunziekte kunnen vormen. Derhalve zijn de meeste onderzoeken die betrekking hebben op een vaccin tegen groep B meningococcus gericht op het potentieel gebruik van subkapselbestanddelen zoals buitenmembraaneiwitten (OMP) en lipopolysacchariden (LPS).

25 Zo beschrijven Jennings et al. conjugaten van tetanustoxoïde (TT) met van meningococcus LPS afgeleide gedefosforyleerde oligosacchariden (OS\*). De immunogeniteit van deze OS\*-TT-conjugaten werd in konijnen onderzocht (Infect. Immun. 43:407-412). Hierbij werd fosforethanolamine verwijderd van de meningococcus oligosacchariden (OS) door behandeling 30 met waterstofferfluoride. De gedefosforyleerde oligosacchariden werden vervolgens gekoppeld met tetanustoxoïde. Het aldus verkregen immunotype L<sub>3</sub> OS-eiwitconjugaat was slechts enigszins immunogeen bij konijnen, hetgeen waarschijnlijk kan worden verklaard door verwijdering van de PEA-groepen.

35 In Infection and Immunity, maart 1991 blz 843-851, beschrijven Verheul et al. de bereiding van meningococcus OS-eiwit-conjugaten met tetanustoxoïde, waarbij de fosforethanolaminegroepen van de oligosacchariden gehandhaafd zijn.

In vrijwel alle oligosaccharide-peptideconjugaten die tot dusver bekend zijn is het saccharidegedeel, dat B-cel activering verzorgt, gekoppeld aan een peptide dat T-helpercel activering verzorgt, waarbij saccharidegedeel en peptidegedeel afkomstig zijn van een ander organisme.

5 Meestal wordt hiervoor een tetanus- of difteriepeptide gebruikt. Het gebruik van vaccins die conjugaten bevatten die aan dergelijke eiwitten zijn gekoppeld heeft als nadeel dat het zal kunnen leiden tot overgevoeligheid of tolerantie voor genoemde tetanus- of difteriedrager en zal kunnen leiden tot verminderde respons op het B-cel activerende deel.

10 Het gebruik van saccharide-peptide-conjugaten die voorzien zijn van homoloog dragerpeptide of het homologe eiwit heeft dit nadeel niet en een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat zal bij contact met het micro-organisme in kwestie behalve B-cel geheugen tevens T-cel geheugen reactiveren. Door de koppeling van B-cel activerend deel aan een T-

15 helpercel activerend deel dat afkomstig is van een homoloog eiwit of een daarvan afgeleid peptide-fragment wordt derhalve het nadeel van overgevoeligheid, tolerantie of suppressie die door het gebruik van saccharide-peptide-conjugaten, die een niet homologe peptidedrager omvatten, als bestanddelen van vaccins dreigt te ontstaan, vermeden.

20 Er zijn saccharide-peptide-conjugaten bekend die een homologe dragerpeptide omvatten. Paton et al. beschrijven conjugatie van pneumolysine-toxoïde aan type 19F kapselpolysaccharide van Streptococcus pneumoniae (Infection and Immunity, juli 1991, blz 2297-2304).

Tevens zijn er saccharide-peptide-conjugaten bekend die een homoloog dragerpeptide omvatten die als immuniteit verlenend B-cel activerend deel een saccharidegedeel omvatten dat van een lipopolysaccharide (LPS) van een gramnegatieve bacterie is afgeleid. Een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat biedt als voordeel de mogelijkheid een vaccin te maken dat immuniteit verschafft tegen gramnegatieve bacteriën, waarvan de kapsel-

30 polysacchariden geen of onvoldoende immuunreactie opwekken.

In Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger, 1989, vol 10, blz 166-189 beschrijven Cryz, J.C. et al. vaccins tegen Pseudomonas aeruginosa die een saccharide-peptide-conjugaat omvatten dat gedetoxificeerde lipopolysaccharide van Pseudomonas aeruginosa immunotype 5 omvat, welke

35 lipopolysaccharide gekoppeld is met diverse dragereiwitten. De dragereiwitten kunnen zowel homoloog als niet homoloog zijn. De dragereiwitten die in dit artikel genoemd worden zijn tetanustoxoïde, toxine A en pili van Pseudomonas aeruginosa.

Het LPS van Pseudomonas aeruginosa wordt volgens dit artikel onschadelijk gemaakt door estergebonden vetzuren van Lipide A te verwijderen, zodat het serologisch actieve O-polysaccharideerdeel kan worden opgenomen in een saccharide-peptide-conjugaat. Dergelijk gedetoxificeerd LPS (D-LPS) werd omgezet in een actieve ester door koppeling aan N-hydroxysuccinimide en vervolgens werd de actieve ester gekoppeld aan een eiwit dat ter vergemakkelijking van de koppeling voorzien was van een spacer (1,4-diaminobutaan). Het D-LPS-TA-conjugaat was niet immunogeen maar het D-LPS-pili-conjugaat en het D-LPS-TT-conjugaat wel.

10 Een bacteriegroep waarvan kapselpolysacchariden geen of weinig immuunreactie opwekken is groep B meningococcus, een bacteriegroep die in vele landen meer dan 50% van de meningococcus ziektegevallen veroorzaakt (Poolman et al., The Lancet, september 1986, blz. 555-558). Zoals reeds beschreven omzeilt een vaccin dat een saccharide-peptide-conjugaat met

15 een van meningococcus B lipopolysaccharide afgeleid immuniteit verlenend B-cel activerend deel omvat, een nadeel van saccharide-peptide-conjugaten die kapselpolysacchariden omvatten, namelijk het feit dat de aanzienlijke overeenkomst in structuur tussen de groep B-kapselpolysacchariden en menselijke glycolipiden kan leiden tot autoimmunziekte.

20 Een saccharide-peptide-conjugaat dat als immuniteit verlenend B-cel activerend deel lipopolysaccharide omvat heeft echter ook nadelen. Lipopolysaccharide bevat toxische delen en een saccharide-peptide-conjugaat dat een lipopolysaccharide met toxische delen omvat zal eveneens toxisch zijn.

25 De onderhavige uitvinding heeft derhalve betrekking op een saccharide-peptide-conjugaat waarvan het saccharideerdeel ten minste een van een lipopolysaccharide (LPS) van een gramnegatieve bacterie afgeleid immuniteit verlenend B-cel activerend deel met ten minste één epitool omvat en het peptidedeel ten minste een homoloog eiwit of een van een homoloog

30 eiwit afgeleid peptide-fragment met een T-helpercel activerend deel met ten minste één epitool omvat, (waarbij homoloog wil zeggen dat het B-cel activerende deel en het T-helpercel activerende deel in hetzelfde organisme voorkomen) gekenmerkt doordat ten minste het B-cel activerende deel het LPS-oligosaccharide deel (core region) of een daarvan afgeleid fragment omvat.

35 Gebruik van een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat, dat als B-cel activerend deel de LPS "core region" of een daarvan afgeleid fragment omvat als bestanddeel van een vaccin, zal veiliger zijn dan gebruik van een saccharide-peptide-conjugaat dat natieve LPS omvat vanwege het ont-

breken van toxische delen. Een dergelijk "core" bevattend saccharide-peptide-conjugaat heeft het voordeel dat het een groter aantal verschillende LPS "core" B-cel activerende delen kan bevatten dan een SPC met natieve LPS dat toxisch wordt wanneer teveel van het toxische bestanddeel 5 lipide A wordt ingebouwd.

De lipopolysacchariden van meningococcus zijn ook toxisch. Lipopolysaccharide van meningococcus omvat drie delen. In figuur 1 wordt een LPS van meningococcus weergegeven. Het lipide A deel is toxisch en de lacto-N-neotetraose-eenheid, kan eventueel tot inductie van auto-anti-10 lichamen leiden. Het oligosaccharideerdeel van meningococcus LPS, de zogenaamde "core region" is niet toxisch. De zogenaamde "inner core region" is dat deel van de "core region" van het oligosaccharideerdeel van meningococcus LPS waarvan de lacto-N-neotetraose-eenheid ontbreekt. Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat een B-cel activerend 15 deel omvat, dat de "core" oligosaccharide van meningococcus of een daarvan afgeleid fragment omvat, is een geschikt voorbeeld van een SPC volgens de uitvinding.

Een saccharide-peptide-conjugaat, dat in het van meningococcus afgeleide saccharideerdeel geen toxische lipide A en evenmin de lacto-N-neo-20 tetraose-eenheid omvat, welke eenheid vanwege structuur overeenkomst met de gastheer eventueel tot inductie van auto-antilichamen kan leiden, is bekend uit het reeds geciteerde artikel van Jennings et al. Dit saccharide-peptide-conjugaat verschilt echter van het saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat de aanwezigheid van het tetanus 25 toxoïde als peptidedeel in plaats van een homoloog eiwit of een daarvan afgeleid peptide fragment. De nadelen van een dergelijk niet-homoloog eiwit bevattend conjugaat zijn reeds hiervoor beschreven.

Men kan natieve LPS isoleren en vervolgens lipide A en de tetraose-eenheid verwijderen. Lipopolysaccharide (LPS) van meningococcus bijvoor-30 beeld kan worden geïsoleerd via de extractie werkwijze met heet water en fenol van Westphal (Westphal, O. en Jann, J.K., 1965, Methods Carbohydr. Chem. 5, 83-91). In het kort wordt LPS gehydrolyseerd in 1%-azijnzuur totdat flocculatie optreedt. Lipide A wordt verwijderd door te centrifugeren en de oligosacchariden worden gezuiverd over een Biogel kolom. 35 Vervolgens kan de hoofd-oligosaccharide worden gekoppeld aan het peptidedeel.

Men kan op een dergelijke wijze verkregen "core" oligosaccharide of een werkzame afgeleide daarvan opnemen in een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding.

9101359

Omdat het verkrijgen van een van natieve LPS afgeleid B-cel activeerend deel een moeizaam proces is en het volledig zuiveren van de "core" oligosaccharide eveneens problematisch is, verdient het de voorkeur het B-cel activerende deel van een saccharide-peptide-conjugaat volgens de 5 uitvinding te synthetiseren. Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding omvat met voorkeur derhalve een synthetisch B-cel activerend deel in het saccharideerdeel.

De saccharide-peptide-conjugaten volgens de uitvinding zijn bij voorkeur geconjugeerd via een spacer. Dit heeft als voordeel dat geen 10 intramoleculaire reacties optreden tussen de reactieve groepen van het saccharideerdeel en het peptidedeel. Dergelijke reacties kunnen leiden tot een gewijzigde tertiaire structuur van het saccharideerdeel en/of peptidedeel, met als gevolg verslechterde immuunwerking.

Een aantal LPS immunotype specifieke epitopen hebben hun werking te 15 danken aan de aanwezigheid van ten minste een fosforethanolamine (PEA) groep. Derhalve verdient een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat een dergelijk B-cel activerend deel omvat de voorkeur wanneer PEA-groepen van het B-cel activerende deel van het saccharideerdeel vrije aminogroepen omvatten. Een voorbeeld van een dergelijk saccharide- 20 peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat een immuunspecifiek B-cel activerend deel omvat, is een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding waarvan het saccharideerdeel LPS van meningococcus met immuuntype L<sub>3</sub> omvat. Een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat, dat een immuunspecifieke epitoot van immunotype L<sub>3</sub> omvat, zal bij voorkeur een B- 25 cel activerend deel omvatten waarvan de PEA-groepen vrije aminogroepen hebben.

Saccharide-peptide-conjugaten volgens de uitvinding omvatten met voordeel een B-cel activerend deel dat kruisreactie kan geven met meer dan een immunotype. Een vaccin dat een dergelijk saccharide-peptide-con- 30 jugaat volgens de uitvinding omvat zal bescherming geven tegen meer dan één immunotype.

Momenteel zijn twaalf verschillende typen lipopolysacchariden bekend voor meningococcus stammen (hetgeen overeenkomt met 12 immunotypen). De verschillen in de meningococcus LPS immunotypen zijn gelokaliseerd in het 35 oligosaccharide deel van het LPS ("core region"). Sinds kort zijn de volledige primaire structuren van de oligosacchariden opgehelderd voor immunotypen L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>5</sub> en L<sub>6</sub>; deze worden weergegeven in figuur 2 (Difabio J.L. et al, 1990, Structure of the L1 and L6 core oligosaccharide of *Neisseria meningitidis*. Can. J. Chem. 86:1029-1034;

Jennings, H.J. et al. 1987, Structure and Immunochemistry of meningo-coccal lipopolysaccharides, *Anthonie van Leeuwenhoek* 53:519-522; Michon, F. et al. 1990, Structure of the L5 lipopolysaccharide core oligosaccharide of *Neisseria meningitidis*, *J. Biol. Chem.* 256:7243-7247;  
 5 Verheul, A.F.M. et al niet gepubliceerd, *Infection and Immunity*; in press). In figuur 3 zijn de structuren van de grootste L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, moleculen weergegeven.

Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat een of meer oligosacchariden met de structuren die in figuur 2 worden weergegeven omvat, is bruikbaar als bestanddeel van een vaccin dat tegen ten minste een immunotype van meningococcus is gericht. Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat ten minste het B-cel activerende deel van ten minste een van de oligosacchariden uit figuur 2 omvat kan derhalve met voordeel als bestanddeel van een vaccin, dat tegen ten minste een immunotype van meningococcus is gericht, worden gebruikt.  
 10  
 15

De oligosacchariden van de immunotypen verschillen in monosaccharide-samenstelling, hoeveelheid en locatie van fosforethanolamine (PEA) groepen en de mate van acetylering van de  $\alpha(1\rightarrow2)$  gebonden GlcNAc-eenheid of ander eenheden. Voor de meeste immunotypen is de basis-structuur van 20 de oligosaccharide "core" gelijk (figuur 1 en figuur 2).

Omdat de "core" oligosacchariden van meningococcus LPS voor diverse immunotypen overeenkomsten vertonen, omvat de "core" meer dan een immunotype specifieke epitoot. Een SPC volgens de uitvinding dat een dergelijke "core" als B-cel activerend deel omvat, zal de voorkeur verdienen. Een 25 dergelijk SPC volgens de uitvinding kan voor een aantal verschillende immunotypen tegelijk B-cel activerend werken. Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat voor een aantal immunotypen tegelijk B-cel activerend kan werken kan ook een afgeleid fragment omvatten, dat meer dan een immunotype specifieke epitoot omvat.

30 Het is ook mogelijk slechts een relevant gedeelte van de "core" oligosaccharide als fragment op te nemen in een SPC volgens de uitvinding, dat specifiek immuniteit voor een specifiek immunotype verschafft. Het is ook mogelijk in het saccharidegedeelte van een SPC volgens de uitvinding meer dan één B-cel activerend deel op te nemen, zodat een dergelijk 35 SPC diverse specifieke immuniteit verlenende B-cel activerende delen omvat en dus immuniteit voor diverse specifieke immunotypen kan verschaffen.

Men kan met voordeel B-cel activerende delen met specifieke immuniteit verlenende werking tegen verschillende immunotypen of B-cel active-

9 1 0 1 3 5 9

rende delen met kruisreactieve immuniteit verlenende werking in het saccharideerdeel van een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding opnemen. Het is mogelijk geworden goed gedefinieerde oligosacchariden met toenemende complexiteit en molecuulgewicht te synthetiseren, zodat 5 oligosacchariden die een of meer B-cel activerende structuren omvatten gesynthetiseerd kunnen worden.

Van de meningococcus is bekend dat immunotypen L3 en L2 respectievelijk ongeveer 70% en 30% van de groep B meningococcus meningitis veroorzaken. Derhalve verdienent saccharide-peptide-conjugaten volgens de uitvinding de voorkeur die ten minste B-cel activerende delen van L3 en/of L2 immunotypen in het saccharideerdeel van het saccharide-peptide-conjugaat omvatten. In een nog te publiceren abstract beschrijven Borrow, R. et al (Symposium 27-08-91, Bacterial Meningitis, Nottingham G.B.) dat immunotype L<sub>3,7,9</sub> specifiek geassocieerd is met invasieve ziekte, veroorzaakt 15 door N.meningitidis, omdat zij bij 97% van de ziektegevallen deze epitool waarnemen.

Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat ten minste een B-cel activerend deel van het saccharideerdeel omvat dat een afgeleide is van

20  $\beta$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 4) - L- $\alpha$ -D-Hepp - (1 $\rightarrow$ 5) - KDO

3

↑

1

25 L- $\alpha$ -D-Hepp3 < - PEA

2

↑

1

$\alpha$ -D-GcNAc

30 heeft specifieke immuniteit verlenende werking tegen immunotype L<sub>3</sub>.

Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat ook specifieke immuniteit verlenende werking tegen immunotype L<sub>3</sub> vertoont, omvat als B-cel activerend deel van het saccharideerdeel een oligosaccharide dat ten minste

L- $\alpha$ -D-Hepp

3

1

1

5 L- $\alpha$ -D-Hepp

2

↑

1

$\alpha$ -D-GcNAc

10 omvat. Een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat dat bovendien in het B-cel activerende deel van het saccharideerdeel ten minste één PEA-groep bevat verdient de voorkeur.

Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat als B-cel activerend deel in het saccharideerdeel een oligosaccharide omvat met als 15 uiteinde  $\beta$ -D-GlcP(1-4),  $\alpha$ -D-GlcNAcp of L- $\alpha$ -D-Hepp(1-5) heeft specifieke immuniteit verlenende werking tegen immunotype L<sub>2</sub>.

Een voorbeeld van een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding omvat als B-cel activerend deel van het saccharideerdeel een afgeleide van de vertakte oligosaccharide

20  $\beta$ -D-GlcP (1-4)-L- $\alpha$ -D-Hepp - (1-5) - KDO

3

↑

1

$\alpha$ -D-GlcP (1-3)-L- $\alpha$ -D-Hepp 6/7 < - PEA

25

2

↑

1

$\alpha$ -D-GlcNAc.

Een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat als 30 B-cel activerende deel van het saccharideerdeel de vertakte oligosaccharide  $\alpha$ -D-GlcP (1-3)-L- $\alpha$ -D-Hepp 6/7 < - PEA

2

↑

1

35  $\alpha$ -D-GlcNAc

omvat, voldoet voor het verschaffen van een immuunreactie tegen immuno-type L<sub>2</sub>.

Een saccharide-peptide-conjugaat dat de voorkeur verdient is een SPC volgens de uitvinding dat een B-cel activerend deel omvat dat ten minste 40 kruisreactie vertoont met twee immunotypen van gram-negatieve bacteriën. Een voorbeeld van een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat vertoont ten minste kruisreactie met meningococcus immunotypen L<sub>2</sub> en L<sub>3</sub>.

Een saccharide-peptide-conjugaat dat eveneens de voorkeur verdient is een SPC volgens de uitvinding dat een B-cel activerend deel omvat dat 45 ten minste kruisreactie vertoont met meningococcus immunotypen L<sub>1</sub> en L<sub>3</sub>.

Een saccharide-peptide-conjugaat dat kruisreactie vertoont met ten minste immunotypen  $L_1$ ,  $L_2$  en  $L_3$ , omvat als B-cel activerend deel in het saccharidegedeel ten minste de vertakte oligosaccharide  $\beta$ -D-Glcp(1-4)-[L- $\alpha$ -D-Hepp(1-3)]-L- $\alpha$ -D-Hepp). Een geschikt voorbeeld van een dergelijk saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding omvat tevens op de vertakte oligosaccharide  $\beta$ -D-Glcp(1-4)-[L- $\alpha$ -D-Hepp(1-3)]-L- $\alpha$ -D-Hepp) een PEA-groep op de 0-3 van de heptosyleenheid.

Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding, dat kruisreactie vertoont met meer immunotypen dan  $L_1$ ,  $L_2$  en  $L_3$ , omvat als B-cel activerend deel in het saccharidegedeel ten minste de vertakte oligosaccharide  $\beta$ -D-Glcp(1-4)-[L- $\alpha$ -D-Hepp(1-3)]-L- $\alpha$ -D-Hepp) die voorzien is van een spacer die verbinding geeft met ten minste een ander immunotype specifiek B-cel activerend deel met ten minste een epitoot.

Een SPC volgens de uitvinding kan als B-cel activerend deel een saccharidegedeel omvatten dat gesynthetiseerd en/of gemodificeerd is ten opzichte van een natuurlijk B-cel activerend deel voor een bepaald immunotype. Een dergelijk gesynthetiseerd en/of gemodificeerd B-cel activerend deel zal met voorkeur kruisreactie geven met diverse immunotypen en/of een verbeterde immuunreactie geven dan het overeenkomstige deel van het natuurlijke LPS.

Een dergelijk gesynthetiseerd en/of gemodificeerd B-cel activerend deel kan ontstaan door selectieve additie en/of deletie van bepaalde groepen en/of suikereenheden.

Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding zal bij voorkeur als peptidedeel, met ten minste een T-helpercel activerend deel, een buitenmembraaneiwit (OMP) of ten minste een van een OMP afgeleid peptidefragment, dat een T-helpercel activerend deel omvat, omvatten. Een vaccin dat een SPC volgens de uitvinding omvat, welk vaccin bescherming kan bieden tegen meningococcus, zal bij voorkeur een SPC volgens de uitvinding, dat een buitenmembraaneiwit of een daarvan afgeleid peptidefragment als T-helpercel activerend deel van meningococcus Klasse I omvat, omvatten. Op het Klasse I buitenmembraaneiwit van meningococcus H44/76 zijn vele herkenningsplaatsen onderzocht voor menselijke T-cellen.

De herkenningsplaatsen voor menselijke T-cellen in Meningococcus H 44/76 klasse 1 OMP zijn onderzocht. Voor systematische identificatie van T-cel epitopen zijn grote aantallen synthetische peptiden nodig.

In de afgelopen paar jaren is vaste-fase peptide-synthese (SPPS) aangepast om simultane bereiding van vele peptiden mogelijk te maken. Een werkwijze van SMPS die nauw verband houdt met traditionele SPPS is ont-

wikkeld door Houghthon (Houghton, R.A. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 3998). Bij deze benadering worden gebruikelijke vaste dragers in permeabele polypropyleenzakken in compartimenten opgenomen (de "theezak"-benadering).

5 Bij de koppelingsstap worden de zakjes gesorteerd in afzonderlijke houders die de geschikte aminozuroplossingen bevatten. Het wassen en het verwijderen van de bescherming van het N-uiteinde worden in afzonderlijke houders uitgevoerd, die alle zakken bevatten. De peptiden worden bereid op een schaal van 10-20 mg. Holm en Meldal ( Holm, A. en Meldal, M. 1989.

10 Multiple column peptide synthesis. In: Peptides 1988. Proc. 20<sup>th</sup> Eur. Pept. Symp. Jung, C. en Bayer, E. (red.), Walter de Gruyter & Co., Berlijn, blz 208-210) hebben manuele meervoudige kolomsynthese op een schaal van 1-5 mg beschreven, die zeer geschikt is voor immunologisch onderzoek. Volledige automatisering van dit type SMPS is bereikt

15 ([Frank, R., Bosserhoff, A., Boulin, C., Epstein, A., Gausepohl, H. en Ashman, K., 1988. Biotechnology 6 1211], [Gausepohl, H., Kraft, M., Boulin, C. en Frank, R.W., 1990, Proc. XI<sup>th</sup> Am. Pept. Symp. Rivier, J. en Marshall, G. (red.) Escom, Nederland, blz 1003-1004] en [Schorrenberg, G., en Lang, R.E., 1990, Proc. XI<sup>th</sup> Am. Pept. Symp. Rivier, J. en

20 Marshall, G. (red.) Escom, Nederland, blz 1029-1030). Tijdens het verloop van het onderzoek naar meningococcus T-cel epitopen is manuele SMP geïntroduceerd. Zeer recentelijk is een in de handel verkrijgbare simultane meervoudige peptidesynthese-inrichting beschikbaar gekomen. Deze inrichting maakt de geautomatiseerde simultane synthese van 48 peptiden

25 op een schaal van 5-20 mg in ongeveer twee weken mogelijk.

Voor het identificeren van T-cel epitopen die in de klasse 1 OMP voorkomen, werd een reeks overlappende peptiden gesynthetiseerd. De reeks bestond uit 45 peptiden die de gehele eiwitsequentie van P1.7,16 omvatten (20-meren met een overlap van 12 eenheden zie figuur 4). De peptiden 30 werden onderzocht op herkenning door T-cellen van vrijwilligers waarvan HLA-type bepaald was. Vaccinatie van de vrijwilligers was niet nodig, aangezien T-cellen met specificiteit voor het meningococcus Klasse 1 eiwit in het periferale bloed van alle onderzochte donoren (n=27) kon worden waargenomen. Daarnaast vertoonden alle proefpersonen antilichaamtiters voor het meningococcus OMP. Aangezien de proefpersonen een negatieve anamnese voor meningococcusziekte vertoonden, moest immuniteit zijn geïnduceerd door asymptomatische infecties ([Goldschneider, I., Gotschlich, E.C., en Artenstein, M.S., 1969, J. Exp. Med. 29: 1307] en

9 1 0 1 3 5 9

[Goldschneider, I., Gotschlich, E.C., en Artenstein, M.S., 1969, J. Exp. Med. 129: 1327]).

De reeks van 45 peptiden werd in lymfocytproliferatie-experimenten onderzocht. Resultaten van een representatief experiment dat werd uitgevoerd met mononucleaire cellen verkregen uit het periferale bloed, worden weergegeven in figuren 5 en 6. T-cel proliferatie werd waargenomen in aanwezigheid van 10 peptiden, hetgeen duidt op het voorkomen van T-cel epitopen in ten minste zes verschillende gebieden van het eiwit.

Teneinde de exacte grootte van de T-cel epitopen te definiëren en om de MHC-restrictie te onderzoeken, werden T-cel kloons gemaakt. Het klasse 1 OMP of een synthetisch peptide werden gebruikt voor de selectie van de kloons. Eerst werden PBMC van tevoren gestimuleerd met het antigeen. Na 7 dagen werden de cellen verzameld en gekloned door beperkende verdunning bij aanwezigheid van bestraalde APC's (PBMC) die een puls met het anti-geen hadden ontvangen. Subklonering werd ten minste eenmaal uitgevoerd. Een voorbeeld van een peptide specifieke T-cel kloon wordt in tabel 1 getoond. Een positieve respons werd verkregen met twee 20-meren met een overlap van 12 residuen.

20

TABEL 1

T-cel herkenning van overlappende synthetische peptiden

	Peptide	Aminozuursequentie	T-celkloon AZ-16.14	
25				Stimulatie-index
	OMP <sub>25-44</sub>	QAANGGASGQVKVTKAK		-
	OMP <sub>33-52</sub>	<u>GQVKVTKAKSRIRTKIS</u>		-
	OMP <sub>41-60</sub>	<u>TKVTKAKSRIRTKISDFGSFIGFK</u>		64
	OMP <sub>49-68</sub>	<u>TKISDFGSFIGFKGSEDLGD</u>		65
30	OMP <sub>57-76</sub>	<u>FIGFKGSEDLGDKAVWQL</u>		3
	OMP <sub>65-84</sub>	DLGDGLKAVWQLEQDVSVAG		-
	geïsoleerd buitenmembraaneiwit (OMP)			55

Gedurende twee uren werden  $5 \times 10^4$  APC's (PBMC) met peptide geïncubeerd (2 $\mu$ g/putje) of als controle met media geïncubeerd in een volume van 100  $\mu$ l/putje in microkweekplaten. Na bestraling (25GY), werden  $2 \times 10^4$  T-cellen in een volume van 50  $\mu$ l aan de putjes toegevoegd. Twee dagen later werden [ $^3$ H]-thymidine toegevoegd en 16 uur later werd proliferatie gemeten in een vloeistof scintillatie telinrichting.

9 1 0 1 3 5 9

Standaard deviatie van de in triplo uitgevoerde experimenten overschreed nooit 10% van het gemiddelde. De stimulatie-index werd berekend als de verhouding van tellen per minuut bij aanwezigheid van Ag ten opzichte van tellen per minuut bij afwezigheid van Ag (afzonderlijke media). (-) In de tabel geeft een stimulatie-index van  $SI \leq 2$  weer.

De minimale sequentie van de epitoot die voor activering van de kloons vereist was werd bepaald. Hier toe werden systematisch peptiden met een steeds kortere lengte (respectievelijk vanaf het N- en C-uiteinde) bereid en onderzocht in proliferatietests (tabel 2).

9101359

TABEL 2.

Het in kaart brengen van de epitopen van T-cel kloon AZ-16.14

Peptide	aminozuursequentie	stimulatie-index
5 LBV 2.0	T K I S D F G S F I G F K	42
LBV 2.1	R T K I S D F G S F I G F K G	36
LBV 2.2	T K I S D F G S F I G F K G	78
LBV 2.3	R T K I S D F G S F I G F K	31
10 LBV 2.4	K I S D F G S F I G F K	25
LBV 2.5	I S D F G S F I G F K	-
LBV 2.6	S D F G S F I G F K	-
LBV 2.7	D F G S F I G F K	-
LBV 2.8	F G S F I G F K	-
15 LBV 2.9	G S F I G F K	-
LBV 2.10	S F I G F K	-
LBV 2.11	F I G F K	-
LBV 2.12	I G F K	-
LBV 2.13	G F K	-
20 LBV 2.14	T K I S D F G S F I G F	31
LBV 2.15	T K I S D F G S F I G	38
LBV 2.16	T K I S D F G S F I	31
LBV 2.17	T K I S D F G S F	-
LBV 2.18	T K I S D F G S	-
25 LBV 2.19	T K I S D F G	-
LBV 2.20	T K I S D F	-
LBV 2.21	T K I S D	-
LBV 2.22	T K I S	-
LBV 2.23	T K I	-
30	Er werden analogen gemaakt van de minimale sequentie waarin één groep werd gesubstitueerd ten einde te bepalen welke groepen essentiëel waren voor T-cel herkenning en/of MHC-interactie. Er werden geen analogen herkend die alanine als substituent omvatten. Er waren echter wel conservatieve substituties mogelijk op posities 50, 51, 54, 57 en 58 (tabel 3).	

9 1 0 1 3 5 9

TABEL 3

Herkenning door T-cel kloon AZ-16.14 van analogen waarin één groep gesubstitueerd is

5

											Stimulatie-index
	S 0	K <sup>50</sup>	I	S	D	F	G <sup>55</sup>	S	F	I <sup>58</sup>	12
	S 1	A									-
10	S 2		A								-
	S 3		A								-
	S 4			A							-
	S 5				A						-
	S 6					A					-
15	S 7						A				-
	S 8							A			-
	S 9								A		-
	S10	R									10
	S11		V								11
20	S12		L								16
	S13			T							-
	S14				E						-
	S15				N						-
	S16					Y					13
25	S17						T				-
	S18							Y			12
	S19								V		-
	S20								L		10

30

Onder toepassing van de benadering die beschreven is, werd een groot aantal T-cel epitopen geïdentificeerd bij klasse 1 OMP. Synthetische peptiden die deze T-cel epitopen bevatten, kunnen worden toegepast in een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding.

35

Ten einde een genetisch bepaald gebrek aan respons voor het drager-molecuul, het peptidedeel van het saccharide-peptide-conjugaat te vermijden, moet de MHC-restrictie van de T-cel epitopen worden onderzocht. In tegenstelling tot antilichamen kunnen T-cellen namelijk slechts een antigeen herkennen wanneer dit wordt gepresenteerd door antigeenpresen-

9 1 0 1 3 5 9

terende cellen in associatie met MHC-moleculen. Aangezien verschillende individuen andere combinaties van MHC-allelen kunnen bezitten, kunnen de epitopen die door deze individuen kunnen worden herkend, verschillen.

Onder toepassing van T-cel kloons en antigeen presenterende cellen 5 die van een panel van vrijwilligers, waarvan de HLA-type bepaald was, werden verkregen, werden restrictie-elementen bepaald. Herkenning van bepaalde peptiden was beperkt tot een afzonderlijk HLA-DR-molecuul. Andere peptiden herkenden meer dan één HLA-molecuul. Deze peptiden verdienen de voorkeur om te worden gebruikt in saccharide-peptide-conjugaten 10 volgens de uitvinding, omdat een dergelijk peptide een saccharide-peptide-conjugaat geeft dat diverse HLA-fenotypes herkent. Een dergelijk SPC kan worden gebruikt als bestanddeel van een vaccin met het voordeel dat met een klein aantal constante peptidesequenties die dergelijke epitopen 15 omvatten de meeste HLA-DR-fenotypen kunnen worden herkend. Het is ook mogelijk het gehele eiwit in een saccharide-peptide-conjugaat op te nemen om te bewerkstelligen dat meer dan 1 HLA-type wordt herkend door het SPC.

Uit de tabel met stimuleringsindexen blijkt dat de dodecameren met nummers 1, 7, 8, 9, 13, 23, 28, 32, 33, 35 t/m 39, 42 t/m 45 (figuur 6) een stimulatie-index van meer dan 15 vertonen. Derhalve is een bruikbaar 20 saccharide-peptide-conjugaat een SPC volgens de uitvinding dat ten minste één T-helpercel-activerend deel met ten minste één epitoot omvat dat afgeleid is van ten minste een werkzaam deel van ten minste één van de dodecameren met nummers 1, 7, 8, 9, 13, 23, 28, 32, 33, 35 t/m 39, 42 t/m 45. Een voorbeeld van een saccharide-peptide-conjugaat dat een stimulatie-index van meer dan 15 vertoonde, is een saccharide-peptide-conjugaat 25 volgens de uitvinding dat als T-helpercel-activerend deel met ten minste één epitoot ten minste een werkzaam deel van de sequentie KISDFGSFI of een daarmee equivalente sequentie omvat. Zoals blijkt uit tabel 3 is een saccharide-peptide-conjugaat dat de sequentie KLSDFGSFI omvat eveneens in 30 staat een goede stimulatie-index te leveren. Ook een saccharide-peptide-conjugaat dat als T-helpercel-activerend deel met ten minste één epitoot ten minste een werkzaam deel van de sequentie KISDYGSFI omvat, blijkt goed T-cel stimulerend te werken. Dit zijn voorbeelden van saccharide-peptide-conjugaten volgens de uitvinding, waarvan het T-helpercel-active- 35 rende deel met ten minste één epitoot van het peptidegedeelte gemuteerd is, zodat beter contact gemaakt kan worden met een T-helpercelreceptor.

Het is gebleken dat een T-helpercel-activerend deel dat aan beide uiteinden van de epitoot wordt voorzien van lysinegroepen, een betere stimulatie leverde, wanneer gekeken werd naar de verhouding van

dosis/respons (figuur 7). Derhalve verdient een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat als T-helpercel-activerend deel met ten minste één epitoot aan beide uiteinden voorzien is van lysinegroepen de voorkeur.

5 In figuur 8 zijn een aantal peptide-sequenties weergegeven met de bijbehorende MHC-restrictie. Uit de figuur blijkt dat de peptide VPRISYAHGFDLIERGKKKG HLA-DR1 en DR7 herkent. Een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat deze peptide-sequentie omvat, verdient de voorkeur omdat meer dan één HLA-fenotype wordt herkend.

10 De onderhavige octrooiaanvraag heeft ook betrekking op een werkwijze voor het bereiden van een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding. Deze werkwijze omvat het koppelen van een saccharide, die ten minste een immuniteit verlenend B-cel activerend deel met ten minste één epitoot omvat, met een peptide, dat ten minste een T-helpercel activerend 15 deel met ten minste één epitoot omvat, waarbij het T-helpercel activerende deel uitmaakt van een homoloog eiwit of een daarvan afgeleid peptidefragment, waarbij het B-cel activerende deel en het T-helpercel activerende deel in hetzelfde organisme voorkomen.

20 Men kan saccharide en peptide koppelen onder toepassing van algemeen bekende werkwijzen die men toepast voor het koppelen van saccharide en peptide bij bekende saccharide-peptide-conjugaten.

Voor het specifiek koppelen van koolhydraten is de aanwezigheid van geschikte groepen zoals een amino (-NH<sub>2</sub>), carbonzuur (-COOH), thiol (-SH) of een aldehyd (CHO) noodzakelijk binnen het koolhydraatantigeen (Dick, 25 W.E. et al, 1989, Glycoconjugates of bacterial carbohydrate antigens. In Cruse J.M. en R.E. Lewis, Conjugate vaccines. Contrib. Microbiol. Immunol., Basel, Krager, 10:48-114). Deze groepen kunnen aanwezig zijn in het antigeen maar moeten vaak via chemische of enzymatische werkwijzen worden opgenomen. Het verdient de voorkeur een koppelingswijze toe te 30 passen die resulteert in zo min mogelijke modificatie van het koolhydraatantigeen. Het gebruik van een specifiek aan te brengen spacer is hiervoor bevorderlijk. Het verdient de voorkeur zo min mogelijk de aanwezige epitoot of epitopen te vernietigen of ongewenste immuno-dominante neo-antigenen te genereren. De invloed van de koppelingswerkwijze op de 35 immunologische eigenschappen van een oligosaccharide-peptideconjugaat is groot wanneer kleine oligosacchariden worden toegepast (Hoppner, W., et al, 1985, Study on the carbohydrate specificity of antibodies formed in rabbits to synthetic glycoproteins with the carbohydrate structure of asialoglycophorin A. Mol Immunol. 12:1341-1348).

De meeste bestaande vaccins zijn gebaseerd op kapselpolysacchariden of O-antigenen die bestaan uit zich herhalende eenheden van 1 tot 8 monosaccharide zodat de invloed van de koppeling kan worden geminimaliseerd door het gebruik van grotere oligosacchariden. Meningococcus LPS bevat 5 geen herhalende eenheden en derhalve zal met name de keus van de koppelingswerkijze bij het gebruik van meningococcus LPS van belang zijn voor de immunologische en immunochemische eigenschappen van het resulterende conjugaat.

10 Bij voorkeur koppelt men dus de saccharide aan het peptide via een spacer die aan de uiteinden reactieve groepen zoals  $\text{NH}_2$  en  $\text{COOH}$  bevat. Het gebruik van een spacer bij saccharide-peptide-conjugaten volgens de uitvinding heeft als voordeel dat de tertiaire structuur van het saccharideel niet gewijzigd wordt, hetgeen van belang is voor de immuunwerking van de saccharide.

15 Bij de meningococcus oligosacchariden zijn er twee groepen beschikbaar die kunnen worden gebruikt voor het koppelen van een dergelijke oligosaccharide aan dragerpeptide: de vrije aminogroep van de fosforethanolaminegroep (PEA-groep) en de carbonzuurgroep van de KDO-eenheid (figuur 1). De PEA-groep dient bij voorkeur niet te worden gebruikt voor 20 de koppeling omdat deze groep waarschijnlijk deel uitmaakt van een aantal van de immunotype specifieke epitopen. Derhalve verdient het de voorkeur in een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding fosforethanolaminegroepen te behouden met vrije aminogroepen. Gewoonlijk kunnen saccharide-peptide-conjugaten worden gemaakt op basis van het koppelen 25 van de carbonzuurfunctie van de oligosaccharide aan de vrije aminogroepen van het peptide. Wanneer deze werkijze wordt toegepast bij de meningococcus oligosaccharide kan dit resulteren in koppeling van oligosaccharide aan oligosaccharide of van oligosaccharide aan carbonzuurgroepen van het peptide door de PEA-groep van de oligosaccharide. 30 Jennings et al. (Infect. Immun. 43:407-412) hebben dit probleem opgelost door de PEA-groepen te verwijderen door behandeling met waterstoffluoride. De gedefosforyleerde oligosacchariden werden vervolgens gekoppeld aan tetanustoxoïde door  $\beta$ -(4-aminofenyl)ethylamine als spacer aan het reducerende uiteinde op te nemen door middel van reductieve 35 aminering (hetgeen leidde tot verlies van de ringstructuur van KDO), gevolgd door activering van de aminofunctie met thiofosgeen gevolgd door koppeling aan tetanustoxoïde. Dergelijke conjugaten met immunotype  $L_2$ ,  $L_5$  en  $L_{10}$  waren zeer immunogeen in konijnen terwijl die van  $L_3$  slecht immunogeen waren. Voor deze laatste groep blijkt het verlies van PEA-

groepen en/of ringstructuur van de KDO-groep van belang te zijn voor de immuniteit en verdient het de voorkeur een saccharide-peptide-conjugaat met L<sub>3</sub> oligosaccharide van meningococcus te maken waarbij de PEA-groepen en de KDO-ringstructuur van de meningococcus oligosaccharide zo min mogelijk zijn gemodificeerd.

Voor het bereiden van een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding waarvan de B-cel activerende werking afhangt van de aanwezigheid van een of meer fosforethanol (PEA) groepen voldoen bovengenoemde werkwijzen niet. Voor het bereiden van dergelijke saccharide-peptide-10 conjugaten zijn additionele maatregelen nodig.

Een mogelijkheid voor het bereiden van een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat het bovengenoemde probleem oplost is het gebruiken van een saccharideerdeel dat synthetisch verkregen is.

Met de huidige technieken is het mogelijk oligosacchariden te synthetiseren. Bovendien, zoals eerder beschreven is in deze octrooiaanvraag, kan het, in het geval van saccharide-peptide-conjugaten die van LPS afgeleide oligosacchariden omvatten, voordelig zijn het B-cel activerende deel dat zich in de "inner core" van LPS bevindt te synthetiseren. Een ander voordeel van een synthetisch verkregen saccharideerdeel is gelegen in de mogelijkheid de minimale saccharide die B-cel activerend werkt in het SPC volgens de uitvinding op te nemen. Bovendien is het ook mogelijk een saccharideerdeel te synthetiseren dat een minimale oligosaccharide omvat met kruisreactieve immuniteit verlenende werking. Het is ook mogelijk B-cel activerende delen te synthetiseren die een betere immuunwerking geven dan de natuurlijke oligosacchariden.

Men kan met een synthetisch verkregen saccharideerdeel eenvoudiger de spacer op een specifieke plaats aanbrengen. Men kan tevens een of meer fosforethanol groepen inbouwen in het B-cel activerende deel ter verkrijging van een verbeterde immuunwerking.

Teneinde de spacer op een specifieke plaats in de saccharide aan te brengen verdient het de voorkeur de reactieve groepen van de saccharide van beschermende groepen te voorzien voordat men de spacer koppelt. De reactieve groep waar de koppeling met de spacer plaatsvindt voorziet men niet van een beschermende groep. Door deze werkwijze wordt voorkomen dat groepen die essentieel zijn voor de immuniteit verlenende werking tijdens het koppelen van de spacer worden verwijderd of gewijzigd.

Het verdient de voorkeur bij het bereiden van een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding de reactieve groepen van de saccharide die tijdens de bereiding van het saccharide-peptide-conjugaat niet

mogen reageren te voorzien van beschermende groepen P, en reactieve groepen van de saccharide die tijdens de bereiding van het saccharide-peptide-conjugaat specifiek moeten reageren te voorzien van beschermende groepen T, waarbij de beschermende groepen T selectief ten opzichte van elkaar en ten opzichte van de beschermende groepen P afgesplitst kunnen worden. Bij een dergelijke werkwijze is gebleken dat de combinatie van een allylgroep als beschermende groep T en een benzylgroep als beschermende groep P geschikt is. Voor een deskundige zullen andere geschikte combinaties die aan bovengenoemde eis voldoen voor de hand liggen.

Men kan met voordeel bij de werkwijze volgens de onderhavige octrooiaanvraag als uitgangsproduct een saccharide nemen die ten minste één hydroxylprecursor bevat. Een geschikte hydroxylprecursor voor deze werkwijze is de groep  $\text{SiPh}(\text{CH}_3)_2$ . Andere hydroxylprecursors kunnen uiteraard worden toegepast. Men kan een dergelijke hydroxylprecursor op een gewenst tijdstip omzetten tot een hydroxylgroep en deze eventueel gebruiken als reactieve groep waar een specifieke reactie kan plaatsvinden. In het geval van de groep  $\text{SiPh}(\text{CH}_3)_2$  kan men de hydroxylgroep genereren door oxidatie met bijvoorbeeld  $\text{HOOAc}$ .

Bij de werkwijze volgens de uitvinding verdient het de voorkeur de reactieve groep aan het spacer-uiteinde, dat na koppeling met de saccharide vrij blijft, te voorzien van een beschermende groep Z. Hierdoor wordt het mogelijk de saccharide, die voorzien is van een spacer, aan diverse reacties ter modificatie te onderwerpen zonder dat de reactieve groep, die nodig is voor koppeling met het peptide, reactie ondergaat. Uiteraard dient de beschermende groep zodanig te worden gekozen dat deze aanwezig blijft tijdens de modifierende reacties. Men kan bijvoorbeeld de reactieve groep  $\text{NH}_2$  van een spacer voorzien van een beschermende groep Z zoals een benzyloxycarbonylgroep. Men kan ook de reactieve groep  $\text{COOH}$  van een spacer omzetten tot een estergroep. Er zijn talloze voorbeelden bekend uit de literatuur van beschermende groepen die op reactieve groepen van spacers kunnen worden aangebracht. (Met name in de Nederlandse octrooiaanvraag 86.023.25).

Voor het bereiden van een voorkeurs-saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding dat ten minste een PEA groep in het saccharidegedeel omvat kan men een PEA groep op het B-cel activerende deel van het saccharidegedeel aanbrengen. Men kan hiertoe een reactieve groep op ten minste één plaats van de saccharide fosforyleren en het gevormde fosforyleringsproduct omzetten met een ethanolamine waarvan de aminogroep beschermde is door een groep, die verschilt van de beschermende groep Z

van de spacer. Het ethanolamine kan men op geschikte wijze beschermen met trifluoracetyl.

In figuren 9a, b en c wordt een bijzonder geschikt voorbeeld van de werkwijze volgens de uitvinding weergegeven. De stappen 13-16 geven een 5 uitstekend voorbeeld van de fosforyleringsstap die men kan uitvoeren.

Bij de werkwijze volgens de uitvinding kan men de saccharide, die voorzien is van een beschermde spacer, voor de koppeling aan het peptide activeren door de beschermende groep Z van de spacer te verwijderen, waarbij in de saccharide aanwezige PEA-groepen beschermd blijven.

10 Men kan hiertoe de saccharide met de daaraan gekoppelde beschermde spacer aan hydrogenolyse onderwerpen, waarbij zowel de beschermende groep Z van de spacer alsmede de hydroxyl beschermende groepen worden verwijderd, terwijl de PEA-groepen beschermd blijven.

15 Men kan de vrije reactieve groep van de spacer, die door Z werd beschermd, voorzien van een groep die specifieker reageert met het peptide dan de vrije groep van de spacer. Een mogelijkheid die goed voldoet is het in een thiolgroep omzetten van een vrije aminogroep van de spacer. Men kan een saccharideel dat gekoppeld is aan een spacer die een vrije thiolgroep bevat, conjuqueren met een peptide dat gemodificeerd is met een 20 groep die met sulphydryl reactief is. Een geschikt voorbeeld van een dergelijke sulphydryl reactieve groep is broomacetyl. Men kan de broomacetyl groep gemakkelijk verkrijgen met N-succinimidylbroomacetaat.

25 Het verdient de voorkeur PEA-groepen van de saccharide voor en tijdens de koppeling met het (geactiveerde) peptide te beschermen en na de koppeling te verwijderen. Men kan de verwijdering van beschermende groepen zoals trifluoracetyl uitstekend uitvoeren door hydrolyse met een zwakke base zoals ammonia.

#### VOORBEELD

30 In het onderhavige voorbeeld is een werkwijze voor de bereiding van een saccharide-peptide-conjugaat volgens de uitvinding beschreven. Als B-cel activerend deel in het saccharideel is een fragment van de "inner core region" van het LPS-immunotype 6 gekozen. Verder is als T-helpercel bevattend deel van het peptideel de sequentie 47-59 van een Meningo-35 coccus buitenmembraaneiwit gekozen. De werkwijze is weergegeven in figuren 9a,b en c.

De werkwijze omvatte de volgende stappen: reactie van (fenyl-dimethylsilyl)methylmagnesiumchloride (2) met het gemakkelijk toeganke-lijke allyltri-O-benzyl- $\alpha$ -D-manno-hexodialdo-1,5-pyranoside (1). Additie

van verbinding 2 in 1,3-dioxolaan aan 1 in hetzelfde oplosmiddel geschiedde met hoge diastereofaciale selectiviteit, hetgeen het  $\alpha$ -hydroxysilaanadduct van verbinding 3 leverde (d.p.  $\geq 95\%$ ) met een opbrengst van 77%.

5       Benzylering van verbinding 3 gaf verbinding 4 en deallylering in twee stappen gaf homogene verbinding 5 met een opbrengst van 68%. Behandeling van verbinding 5 met Vilsmeier reagens leverde als glycosyldonor verbinding 6 die later werd gekoppeld met de LD-Hepp acceptor 11 die tevens de spacer omvatte, waarvan de synthese in schema 2 is uiteengezet.

10      Glycosylering van 3-(benzyloxycarbonylamino)-1-propanol (8) door het ethyl 1-thio- $\alpha$ -LD-Hepp derivaat verbinding 7, die in acht stappen uit 2,3,4,6,7-penta-0-acetyl-L-glycero-D-manno-heptopyranosylbromide werd bereid bij aanwezigheid van N-jodosuccinimide (NIS) en katalytisch trifluormethaansulfonzuur (TfOH) gaf  $\alpha$ -derivaat 9 met een opbrengst van 80%.

15      Zemplén-deacylering van verbinding 9 leverde verbinding 10 en daaropvolgende regioselectieve benzylering onder phase-transfer (fase-overdracht)-omstandigheden gaf verbinding 11 met een opbrengst van 85%. Stereospecifieke 1,2-trans-glycosylering van acceptor 11 door overmaat van donor 6 kon worden bereikt (zie Schema 3) onder toepassing van de promotor zilvertriflaat, hetgeen na opwerking en zuivering door middel van silicagel-chromatografie homogene disaccharide 12 gaf met een opbrengst van 92% betrokken op verbinding 6. Bij deze werkwijze is de dimethyl(fenyl)silyl-maskerende groep in donor 11 verenigbaar met de glycosideringsomstandigheden.

20      Tussenprodukt 12 werd in het donker geoxideerd, hetgeen verbinding 13 gaf met een opbrengst van 91%. Fosforylering van de vrije hydroxyl-groep in verbinding 13 gaf in drie stappen zonder isolatie van tussenproducten de volledig beschernde gefosforyleerde disaccharide 16. De fosforylering van 13 met behulp van 1-H-tetrazool met het bifunctionele reagens 14 gaf als tussenprodukt fosforamidiet, dat *in situ* werd gecondenseerd en onder soortgelijke omstandigheden werd omgezet met overmaat 2-trifluoracetamidoethanol (15). De fosfiettriëster ( $\delta p$  142,0 en 142,2 dpm) die aldus werd verkregen, werd onmiddellijk geoxideerd, hetgeen het fosfotriësterderivaat 16 met een opbrengst van 81% gaf ( $\delta p$ -3,1 en 3,2 dpm). Partiële verwijdering van de bescherming van verbinding 16 gaf in twee afzonderlijke stappen verbinding 18 met een opbrengst van 56%.

25      De vrije aminogroep van verbinding 18 werd vervolgens onderworpen aan verdere behandeling. Als eerste stap gaf ionogene debenzylering van de fosfotriëstergroep het geladen derivaat 17 ( $\delta p$  0,42 dpm). De tweede

9 1 0 1 3 5 9

stap, de hydrogenolyse van de benzyloxycarbonyl- (Z) en benzylbeschermende groepen, leverde verbinding 18. De  $^1\text{H}$ - en  $^{13}\text{C}$ -NMR-gegevens van verbinding 18 kwamen overeen met de voorgestelde structuur.

De laatste stap in de bereiding van het suiker-peptide-conjugaat omvatte een omzetting in twee stappen van verbinding 18 in het thiolderi-vaat 20 gevolgd door *in situ* condensatie met het broomacetylpeptide 21 en vervolgens verwijdering van de trifluoracetylgroep van 22. Aldus gaf behandeling van verbinding 18 met het reagens pentafluorfenyl-S-acetyl-mercaptoacetaat na zuivering over Sephadex G-25 een homogene verbinding 19. Hydroxylamine werd aan een zuurstofvrije gebufferde oplossing die verbinding 19 en het peptidederivaat 21, dat via een vaste fase benadering bereid was (The *N*-bromoacetyl-Gly-Gly-elongated peptide sequence 47-59 of strain H44/76 class 1 outer membrane protein (*i.e.*, 21) was prepared by continuous-flow solid-phase synthesis on a dimethoxybenzhydryl-amino-resin using *Na*-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)amino acid derivatives, according to standard procedures [Atherton, E. and Sheppard, R.C., solid phase peptide synthesis: a practical approach, IRL Press, Oxford University Press, 1989]. The *N*-terminal bromoacetyl group was introduced during the last cycle of the synthesis [Robey, F.A. and Fields, R.L., *Anal. Biochem.* 1989, 177, 373]. After side-chain deprotection and cleavage from the solid support (TFA/H<sub>2</sub>O, 95/5, 1.5 h, r.t.), the peptide was purified by semi-preparative reverse phase HPLC. FAB mass analysis gave a signal of the protonated molecular ion (MH<sup>+</sup>) at *m/z* 1680.0 (calcd. monoisotopic mass 1679.7) bevatte, toegevoegd.

HPLC-analyse van het ruwe reactiemengsel na 48 uur bij 20°C vertoonde *inter alia* de aanwezigheid van twee hoofdprodukten. Het produkt dat sneller elueerde werd gezuiverd door HPLC en daarna aan FAB MS analyse onderworpen. Het FAB massaspectrum vertoonde een signaal van een geprotooneerd molecuulion (MH<sup>+</sup>) bij *m/z* 2353,2, hetgeen goed overeenkwam met de voorgestelde structuur van het partiëel beschermde conjugaat 22. Ammonolyse van 22, gevolgd door zuivering (HPLC), gaf een homogeen produkt dat, zoals bleek door FAB massaspectroscopie, een geprotoneerd molecuulion bij *m/z* 2257,0 vertoonde, hetgeen de volledige verwijdering van de trifluoracetylgroep en de identiteit van het saccharide-peptide-conjugaat bevestigde.

De spacer in dit voorbeeld is voorzien van een NH<sub>2</sub>-groep die beschermde is met een benzyloxycarbonylgroep (Z). Er bestaan talloze spacers met al of niet beschermde reactieve groepen die bij de werkwijze voor de bereiding van een SPC volgens de uitvinding kunnen worden toe-

gepast. In de Nederlandse octrooiaanvraag 8602325 over saccharide-peptide-conjugaten met saccharide van H-influenza B staan een aantal voorbeelden beschreven van reactieve groepen die bij de onderhavige werkwijze van toepassing kunnen zijn. Het moge duidelijk zijn dat aminogroep NH<sub>2</sub> slechts een voorbeeld is. Spacers met reactieve groepen zoals beschreven in de geciteerde octrooiaanvraag zijn hierin door verwijzing opgenomen.

Ter verduidelijking geldt in het algemeen voor de werkwijze voor bereiding van een SPC volgens de uitvinding dat de fosforylering mogelijk is met vele fosfiet- of fosfaatreactantia in meerstaps-procedures met of 10 zonder isolatie van tussenprodukten. Van groot belang is dat de bescherming van de aminogroep van ethanolamine niet gelijk is aan de bescherming van de reactieve groep van de spacer. In het voorbeeld is de aminogroep van de spacer beschermd met benzyloxycarbonyl (Z) en is de ethanolamine-groep beschermd met een trifluoracetylgroep. De Z-groep kan worden verwijderd door hydrogenolyse, waarbij trifluoracetyl stabiel is. Overigens 15 wordt in het voorbeeld Z gelijktijdig met de Bn-groepen op de suiker verwijderd (Z en Bn geven dus geen orthogonale bescherming ten opzichte van elkaar).

Bij het verwijderen van de bescherming van fosfaatsuiker en spacer 20 wordt eerst de fosfaatbescherming verwijderd. Fosfotriësters zijn labiel; diësters zijn stabiel(er). Om splitsing van de R-O-P of P-O-R' band in de triëster te voorkomen ("verkeerde afbraak") wordt zo spoedig mogelijk de P-O-Bn gesplitst. Daarna ondergaat produkt 17, het TFA-PEA-beschermde suiker - beschermde spacer conjugaat hydrogenolyse met H<sub>2</sub> en een katalysator, waarbij produkt 18, het TFA-PEA-onbeschermde suiker - onbeschermde 25 spacer conjugaat ontstaan. In deze stap vindt hydrogenolyse van de Z-groep en van de benzylgroep plaats.

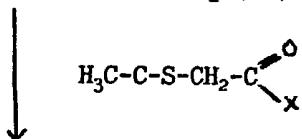
Produkt 18 is geschikt voor conjugatie aan een peptide of een eiwit. De aminogroep van de spacer kan worden gekoppeld met aminogroepen in een 30 peptide of een eiwit (bijvoorbeeld met glutaraaldehyde) of met carbonzuurgroepen in een peptide of een eiwit (bijvoorbeeld met een carbodiimide-derivaat). Dit type conjugaties, hoewel zij niet onbruikbaar zijn bij een werkwijze volgens de onderhavige octrooiaanvraag, verloopt echter chaotisch. Behalve de gewenste suiker-peptide-conjugatie treedt ook 35 inter- en intramoleculaire verknoping op van peptide of eiwit en van primair conjugaat.

Met het synthetische antigeen 18 is een fijnzinniger aanpak mogelijk en verdient deze werkwijze derhalve de voorkeur. De spacer kan via de aminogroep selectief (PEA is immers beschermd) worden voorzien van een

reactieve groep met een meer specifieke reactiviteit. In het voorbeeld is dit een beschermd thiol.

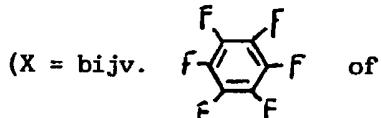
TFA-PEA-suiker-spacer-NH<sub>2</sub> (18)

5



TFA-PEA-suiker-spacer-NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-CO-CH<sub>3</sub> + HOX

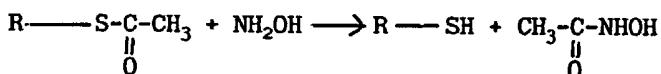
10



produkt 19



15 Produkt 19 kan bij milde pH met hydroxylamine worden omgezet in het vrije thiol.



20 19

20 hydrolyseert verder

Produkt 20 kan reageren met peptiden/proteïnen die zijn gemodificeerd met (een) "sulphydryl-reactieve" groep(en).

Samenvattend wordt bij de werkwijze uit het voorbeeld de forforethanamine (PEA)-groep ingebouwd. Tevens wordt uitsluitend de spaceraminogroep gemodificeerd met een S-acetylmercaptoacetylgroep. De aminogroep van de PEA is immers beschermd met een trifluoracetylgroep. De trifluoracetylgroep zou ook een andere groep mogen zijn. De latere conjugatie van saccharide met peptide verloopt dus bij de werkwijze uit het voorbeeld selectief via de spacer. De trifluoracetylgroep wordt pas na conjugatie verwijderd. De PEA-groep is van groot belang voor de immunologische eigenschappen (Verheul et all, Infect. and Immun. 59, 843-851, 1991) en daarom is een werkwijze waarbij de PEA-groep of -groepen worden beschermd en/of aangebracht, een werkwijze volgens de uitvinding die de voorkeur verdient.

CONCLUSIES

1. Een saccharide-peptide-conjugaat waarvan het saccharideerdeel ten minste een van een lipopolysaccharide (LPS) van een gramnegatieve bacterie afgeleid immuniteit verlenend B-cel activerend deel met ten minste één epitoot omvat en het peptideerdeel ten minste een homoloog eiwit of een van een homoloog eiwit afgeleid peptide-fragment met een T-helpercel activerend deel met ten minste één epitoot omvat, (waarbij homoloog wil zeggen dat het B-cel activerende deel en het T-helpercel activerende deel 10 in hetzelfde micro-organisme voorkomen) met het kenmerk, dat het saccharideerdeel als B-cel activerende deel het LPS oligosaccharide deel (core region) of een daarvan afgeleid fragment omvat.

2. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat ten minste het B-cel activerende deel met ten minste één epitoot gesynthetiseerd is.

3. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste het B-cel activerende deel met ten minste één epitoot is afgeleid van het oligosaccharide deel (inner core) van een LPS van Meningococcus.

4. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel met ten minste één epitoot en het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot zijn geconjugeerd via een spacer.

5. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel met ten minste één epitoot en het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot zijn geconjugeerd met behoud van de vrije aminogroepen van in het B-cel activerende deel aanwezige fosforethanolamine (PEA)-groepen.

6. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat bij het B-cel activerende deel met ten minste één epitoot voor de conjugatie ten minste één PEA-groep is aangebracht.

7. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot is afgeleid van een buitenmembraaneiwit (OMP).

5 8. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot is afgeleid van een Meningococcus Klasse I OMP.

10 9. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot is afgeleid van Meningococcus H44/76 Klasse I OMP.

15 10. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot is afgeleid van Meningococcus P1.7,16.

11. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste één T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot is afgeleid van ten minste een werkzaam deel van ten minste één van de dodecameren uit fig. X met nummers 1, 7, 8, 9, 13, 23, 28, 32, 33, 35 t/m 39, 42 t/m 45.

20 25 12. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het peptidedeel voor meer dan één HLA-fenotype herkenbaar is.

13. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot ten minste een werkzaam deel van de sequentie RTKISDFGSFIGFKG of van een daarmee equivalente sequentie omvat.

30 35 14. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot ten minste een werkzaam deel van de sequentie KISDFGSFI of een daarmee equivalente sequentie omvat.

15. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot gemuteerd is zodat beter contact gemaakt kan worden met MHC van een antigen presenterende cel.

5

16. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat ten minste het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot gemuteerd is zodat beter contact gemaakt kan worden met een T-cel receptor.

10

17. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot ten minste een werkzaam deel van de sequentie KLSDFGSFI of van een daarmee equivalente sequentie omvat.

15

18. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot ten minste een werkzaam deel van de sequentie KISDYGSFI of van een daarmee equivalente sequentie omvat.

20

19. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het T-helpercel activerende deel met ten minste één epitoot gemuteerd is door deze aan beide uiteinden te voorzien van lysinegroepen.

25

20. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel is afgeleid van een oligosaccharideerdeel van een LPS van Meningococcus met immunotype L<sub>3</sub>.

30

21. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 20, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel van het saccharideerdeel een afgeleide is van

$\beta$ -D-GlcP (1 $\rightarrow$ 4) - L- $\alpha$ -D-Hepp - (1 $\rightarrow$ 5) - KDO

3

1

L- $\alpha$ -D-Hepp3 < - PEA

2

1

$\alpha$ -D-GcNAc

35

40

9 1 0 1 3 5 9

22. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 21, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel ten minste

L- $\alpha$ -D-Hepp

$$\begin{array}{c}
 & & 3 \\
 & & \uparrow \\
 & & 1 \\
 & & \uparrow \\
 & & 1 \\
 5 & \xrightarrow{\quad} & L-\alpha-D-\text{Hepp} \\
 & & \uparrow \\
 & & 2 \\
 & & \uparrow \\
 & & 1 \\
 10 & \xrightarrow{\quad} & \alpha-D-\text{GcNAc}
 \end{array}$$

omvat.

23. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 21 of 22, met het  
15 kenmerk, dat het B-cel activerende deel ten minste één PEA-groep bevat.

24. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de conclusies 1-19, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel is afgeleid van een oligosaccharideerdeel van een LPS van Meningococcus met immunotype L<sub>2</sub>.

20

25. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel als uiteinde  $\beta$ -D-Glcp(1-4),  $\alpha$ -D-GlcNAcp of L- $\alpha$ -D-Hepp(1-5) heeft.

25

26. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 24 of 25, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel een afgeleide is van de vertakte oligosaccharide

### $\beta$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 4)-L- $\alpha$ -D-Hepp - (1 $\rightarrow$ 5) - KDO

30

35

### $\alpha$ -D-GlcNAc.

27. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 24-26, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel ten minste de oligosaccharide

40

$\alpha$ -D-Glcp (1 $\rightarrow$ 3)-L- $\alpha$ -D-Hepp 6/7  $\leftarrow$  PEA

45

1

omvat.

9101359

28. Saccharide-peptide-conjugaat volgens één van de conclusies 24-27, met het kenmerk, dat het B-cel activerende deel ten minste één PEA-groep bevat.

5 29. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het saccharideerdeel kruisreactie vertoont met ten minste twee immunotypen van gram-negatieve bacterien.

10 30. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 29, met het kenmerk, dat het conjugaat kruisreactie vertoont met ten minste immunotypen L<sub>2</sub> en L<sub>3</sub> van Meningococcus.

15 31. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 29, met het kenmerk, dat het conjugaat kruisreactie vertoont met ten minste immunotypen L<sub>1</sub> en L<sub>3</sub> van Meningococcus.

32. Saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het saccharideerdeel ten minste de vertakte oligosaccharide  $\beta$ -D-Glcp(1-4)-[L- $\alpha$ -D-Hepp(1-3)]-L- $\alpha$ -D-Hepp) omvat.

20 33. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 32, met het kenmerk, dat de vertakte oligosaccharide  $\beta$ -D-Glcp(1-4)-[L- $\alpha$ -D-Hepp(1-3)]-L- $\alpha$ -D-Hepp) een PEA-groep op de 0-3 van de heptosyl eenheid omvat.

25 34. Saccharide-peptide-conjugaat volgens conclusie 32 of 33, met het kenmerk, dat de vertakte oligosaccharide  $\beta$ -D-Glcp(1-4)-[L- $\alpha$ -D-Hepp(1-3)]-L- $\alpha$ -D-Hepp) voorzien is van een spacer die verbinding geeft met ten minste een andere immunotypespecifiek B-cel activerend deel.

30 35. Werkwijze voor het bereiden van een saccharide-peptide-conjugaat volgens één van de voorgaande conclusies door een saccharide die ten minste een van een lipopolysaccharide (LPS) van een gramnegatieve bacterie afgeleid immuniteit verlenend B-cel activerend deel met ten minste één epitool te koppelen met een peptide dat ten minste een homoloog eiwit of een van een homoloog eiwit afgeleid peptide-fragment met een T-helpercel activerend deel met ten minste één epitool omvat, (waarbij homoloog wil zeggen dat het B-cel activerende deel en het T-helpercel activerende deel in hetzelfde micro-organisme voorkomen) waarbij het

saccharide deel als B-cel activerend deel het LPS oligosaccharide deel (core region) of een daarvan afgeleid fragment omvat.

36. Werkwijze volgens conclusie 35, waarbij men de saccharide via 5 een spacer die aan de uiteinden reactieve groepen zoals  $\text{NH}_2$  en  $\text{COOH}$  bevat, koppelt aan het peptide.

37. Werkwijze volgens conclusie 35 of 36, waarbij de saccharide synthetisch verkregen is.

10

38. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-37, waarbij men de reactieve groepen van de saccharide voorziet van beschermende groepen met uitzondering van de reactieve groep waar de koppeling met de spacer plaatsvindt en daarna de spacer koppelt aan de aldus beschermde saccharide.

39. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-38, waarbij men de reactieve groepen van de saccharide die tijdens de bereiding van het saccharide-peptide-conjugaat niet mogen reageren voorziet van beschermende groepen P, en reactieve groepen van de saccharide die tijdens de bereiding van het saccharide-peptide-conjugaat specifiek moeten reageren voorziet van beschermende groepen T, waarbij de beschermende groepen T selectief ten opzichte van elkaar en ten opzichte van de beschermende groepen P afgesplitst kunnen worden.

25

40. Werkwijze volgens conclusie 39, waarbij de beschermende groep T een allylgroep is en de beschermende groep P een benzylgroep is.

41. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-40, waarbij men als 30 uitgangsproduct een saccharide neemt die ten minste één hydroxylprecursor bevat.

42. Werkwijze volgens conclusie 41, waarbij de hydroxylprecursor-groep de groep  $\text{SiPh}(\text{CH}_3)_2$  is.

35

43. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-42, waarbij men de reactieve groep aan het spacer-uiteinde, dat na koppeling met de saccharide vrij blijft, voorziet van een beschermende groep Z.

44. Werkwijze volgens conclusie 43, waarbij men de reactieve groep  $\text{NH}_2$  van de spacer voorziet van een benzyloxycarbonylgroep als beschermende groep Z.

5 45. Werkwijze volgens conclusie 43, waarbij men de reactieve groep  $\text{COOH}$  van de spacer omzet tot een estergroep.

10 46. Werkwijze volgens conclusies 42-45, waarbij men op een plaats van de saccharide die  $\text{SiPh}(\text{CH}_3)_2$  als hydroxylprecursor bevat een hydroxyl-  
groep genereert door oxidatie met bij voorbeeld  $\text{HOOAc}$ .

15 47. Werkwijze volgens conclusies 35-46, waarbij men een reactieve groep op ten minste één plaats van de saccharide fosforyleert en het gevormde fosforyleringsproduct omzet met een ethanolamine waarvan de aminogroep beschermd is door een groep, die verschilt van de beschermende groep Z van de spacer.

20 48. Werkwijze volgens conclusie 47, waarbij het ethanolamine is beschermd met trifluoracetyl.

25 49. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-48, waarbij men de stappen volgens stappen 13-16 van het reactieschema van fig. 9 uitvoert.

50. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-49, waarbij men de saccharide, die voorzien is van een beschermde spacer, activeert vóór de koppeling aan het peptide door de beschermende groep Z van de spacer te verwijderen, waarbij in de saccharide aanwezige PEA-groepen beschermd blijven.

30 51. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-50, waarbij men de saccharide met de daaraan gekoppelde beschermde spacer onderwerpt aan hydrogenolyse, waarbij zowel de beschermende groep Z van de spacer alsmede de hydroxyl beschermende groepen worden verwijderd, terwijl de PEA-groepen beschermd blijven.

35 52. Werkwijze volgens conclusie 51, waarbij men de vrije reactieve groep van de spacer, die door Z werd beschermd, voorziet van een groep die specifieker reageert met het peptide dan de vrije groep van de spacer.

53. Werkwijze volgens één van de conclusies 35-52, waarbij men een vrije aminogroep van de spacer omzet in een beschermd thiolgroep.

54. Werkwijze volgens conclusie 53, waarbij men het saccharide, dat 5 gekoppeld is aan een spacer die een vrije thiolgroep bevat, conjugeert met een peptide dat gemodificeerd is met een met sulfhydryl reactieve groep.

55. Werkwijze volgens conclusie 54, waarbij de met sulfhydryl reactieve groep broomacetyl is.

56. Werkwijze volgens conclusie 55, waarbij men de broomacetylgroep heeft verkregen met N-succinimidyl-broomacetaat.

15 57. Werkwijze volgens één van de conclusies 34-56, waarbij men PEA-groepen van de saccharide voor en tijdens de koppeling met het (geacti-veerde) peptide beschermt en na de koppeling verwijdert.

20 58. Werkwijze volgens conclusie 57, waarbij men de verwijdering uitvoert door hydrolyse met zwakke base zoals ammonia.

25 59. Vaccin gekenmerkt door een werkzaam gehalte aan saccharide-peptide-conjugaat volgens een van de conclusies 1-34 of aan een volgens de werkwijze van een van de conclusies 35-58 verkregen saccharide-peptide-conjugaat.

FIG. 1

**Groep B kapselpolysaccharide**

$[\alpha\text{-D-NeuNacp}(2\rightarrow8)\text{-}\alpha\text{-D-NeuNacp}]_n$

**Lacto-*N*-tetraose-eenheid**

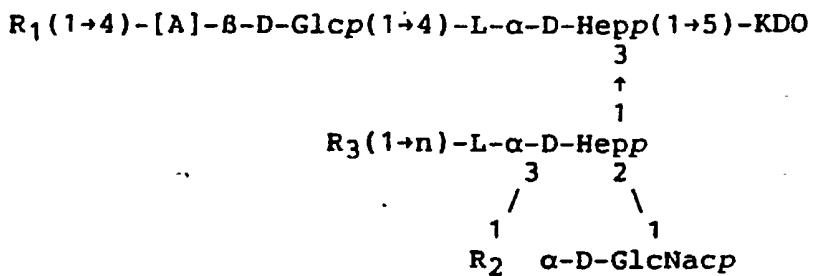
$\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAcp}(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-GlcP}$

**Terminale oligosaccharidestructuur van L1 LPS**

$\alpha\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-D-Galp}$

9101359

FIG. 2



L1:  $R_1 = \alpha\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-Galp}$ , A = -,  $R_2 = \text{PEA}$  en  $R_3 = \text{H}$ , gedeeltelijk 0-geacetyleerd.

L2:  $R_1 = \beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcNAcp}(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-Galp}$ , A = -,  $R_2 = \alpha\text{-D-Glcp}$  en  $R_3 = \text{PEA}(1\rightarrow6/7)$

L3:  $R_1 = \beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcNAcp}(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-Galp}$ , A = -,  $R_2 = \text{PEA}$  en  $R_3 = \text{H}$ .

L4: Dezelfde structuur als L2 uitgezonderd  $R_2 = \text{H}$ .

L5:  $R_1 = \beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)-\beta\text{-D-GlcNAcp}(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-Galp}$ , A =  $\beta\text{-D-Glcp}(1\rightarrow4)$ ,  $R_2 = \alpha\text{-D-Glcp}$ ,  $R_3 = \text{H}$ ,  $\alpha\text{-D-GlcNac}$  is 40% 0-geacetyleerd. Twee kleinere fragmenten werden eveneens geïsoleerd die verschilden met betrekking tot de  $R_1$  structuur en 0-acetylering van  $\alpha\text{-D-GlcNAcp}$ : 1.  $R_1 = \beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)$ , 50% 0-geacetyleerd, 2.  $R_1 = -$  en 30% 0-geacetyleerd.

L6:  $R_1 = \beta\text{-D-GlcNAcp}(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-Galp}(1\rightarrow4)$ , A = -,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{PEA}(1\rightarrow7)$ , gedeeltelijk 0-geacetyleerd.

L7: Gelijk aan L3.

L8: Niet bekend, vergelijkbaar met L1.

L9: Basisstructuur gelijk aan L3 en L7. Positie van PEA-groep niet opgehelderd.

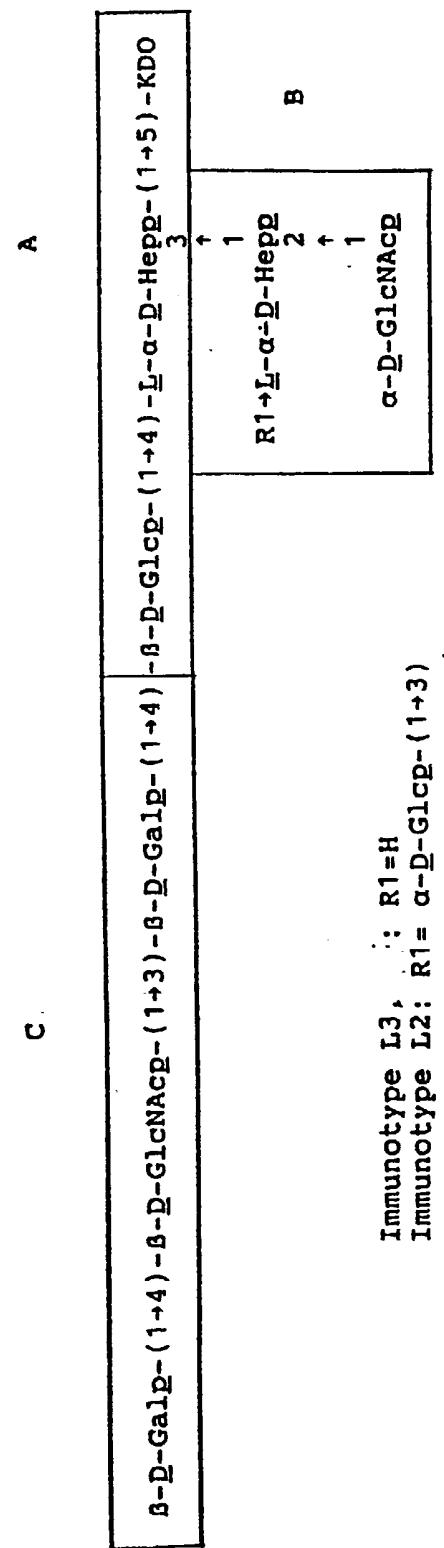
L10-L12: Structuren niet opgehelderd.

FIG. 3

A = lipide A

B = inner core

C = lacto-N-tetraose



9 1 0 1 3 5 9

FIG. 4

1 10 20 30 40 50 60 70  
DVSLYGEIKAGVEGRNYQLQLTEAOAANGGASQVKVTAKSRIRTKISDFGSFIGFKGSEDLGDKAVW  
|-----|  
2 |-----|  
3 |-----|  
4 |-----|  
5 |-----|  
6 |-----|  
7 |-----|  
8 |-----|  
9 |-----|  
10 |-----|  
80 90 100 110 120 130 140  
QLEQDVSVAGGGATQWGNRESFIGLAGEFGTLAGRVANQFDDASQAIIDPLDSNNNDVASQLG1FKRHDNDPVS  
-----
11
12
13
14
15
16
17
18
19
160 170 180 190 200 210 220
YDSPEFSGFSGSVQFVP1QNSKSAYTPAYYTKDTNNNLTLVPAVVGKPGSDVYNAGLYKNGGFAGHYAFKYARH
-----
-----
20
21
22
23
24
25
26
27
28
230 240 250 260 270 280 290
ANVRNAFELFLIGSGSDQAKGTDPKLNHQVHRLTGGYEEGLNLALAQLDSENGDKTKNSTTE1AATASYRF
-----
-----
30
31
32
33
34
35
36
37
38
310 320 330 340 350 360 370
GNAVPRISYAHGFDIFERGKKGENTSYDQIIAGVDYDFSKRTSAIVSGAWLKRNTG1GNYTQINAASVGLRHKF
-----
-----
39 |-----|  
40 |-----|  
41 |-----|  
42 |-----|  
43 |-----|  
44 |-----|  
45 |-----|

9 1 0 1 3 5 9

fig. 5.

T CEL HERKENNING VAN P1,7,16 PEPTIDEN  
45 PEPTIDEN MET 20 GROEPEN OVERLAP = 12

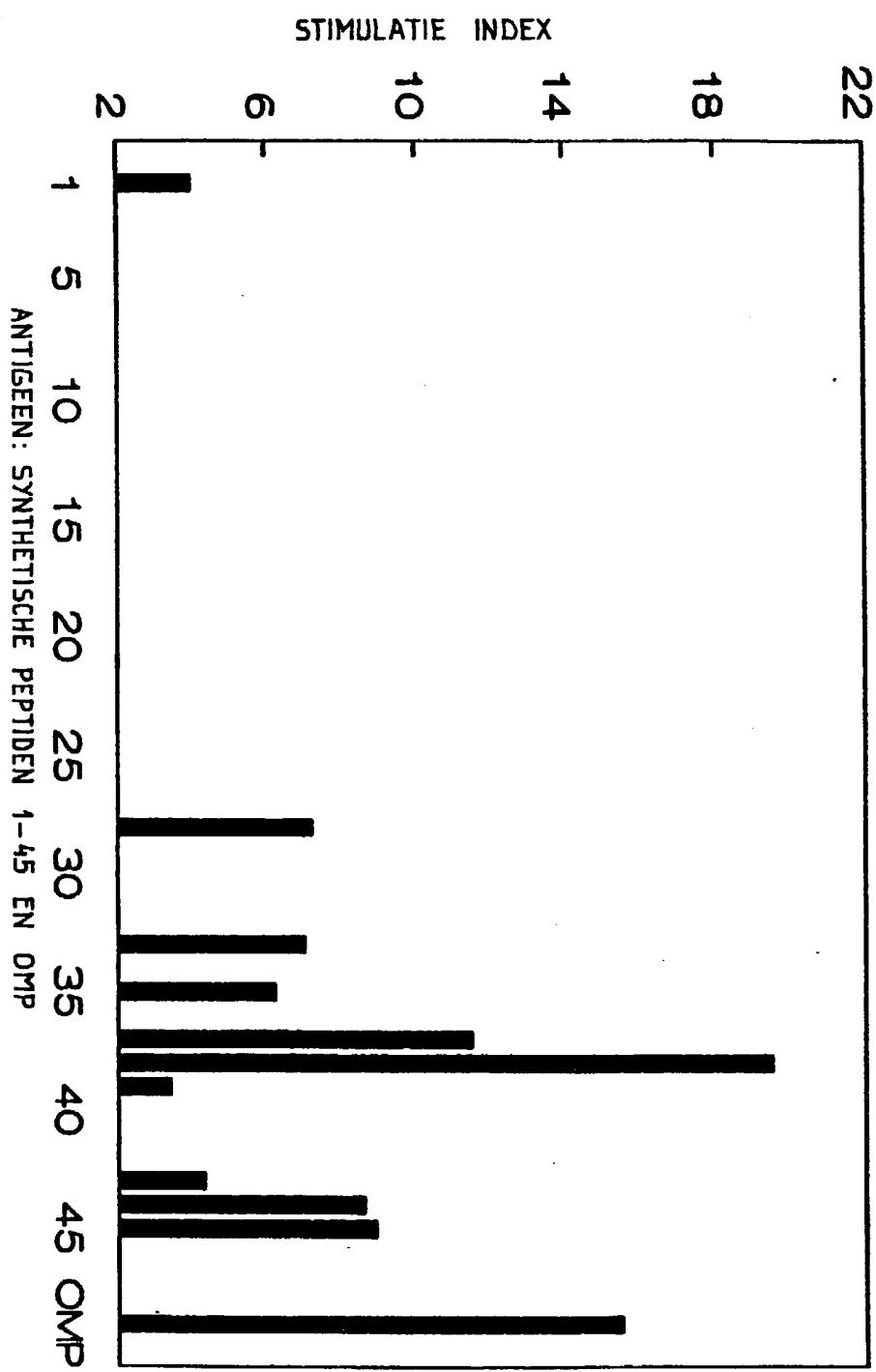
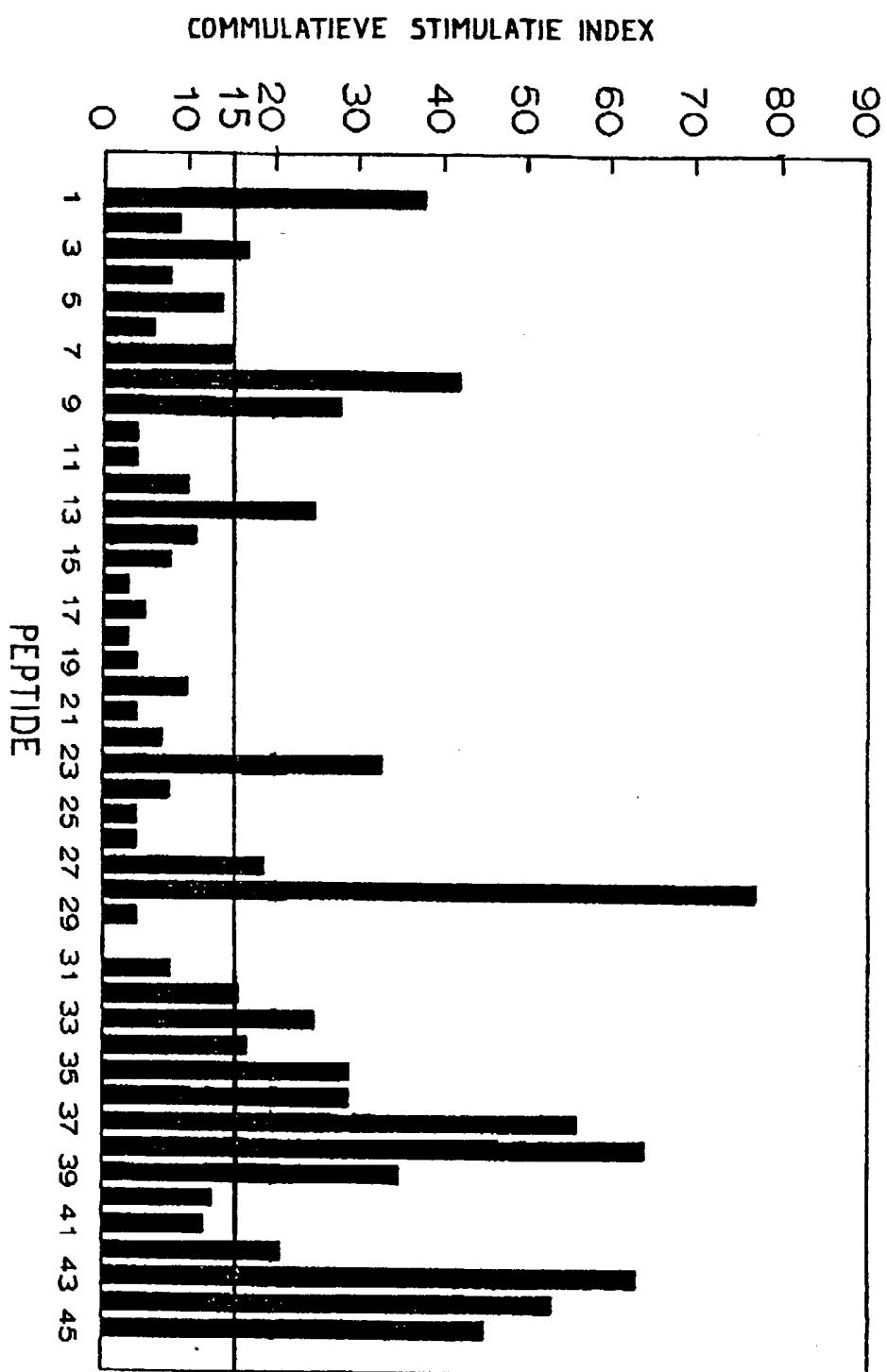


fig. 6.

COMMULATIE VAN RESPONSEN OP PEPTIDEN 1-45

■  $SI > -3$



9 10 13 5 9

FIG. 7

Antigenpresentatie aan LBV 2 specifieke T-cel kloons met behulp van EBV getransformeerde B-cellen.

Peptide	Sequentie	16-5.4	16-5.7	16-5.8	16-2	16-2*
LBV 2	TKISDFGSPIGFKgez.	81	8	9	15	9
LBV 2.4	KISDFGSPIGFK	57	9	5	9	NT
LBV 2.1lysKKK	KISDFGSPIGFKK	NT	NT	NT	NT	8—

NT = not tested

<sup>A</sup> = antigen presenterende cellen zijn perifere bloed lymfocyten (PBL).

\* = peptiden getest met PBL als antigen presenterende cellen.

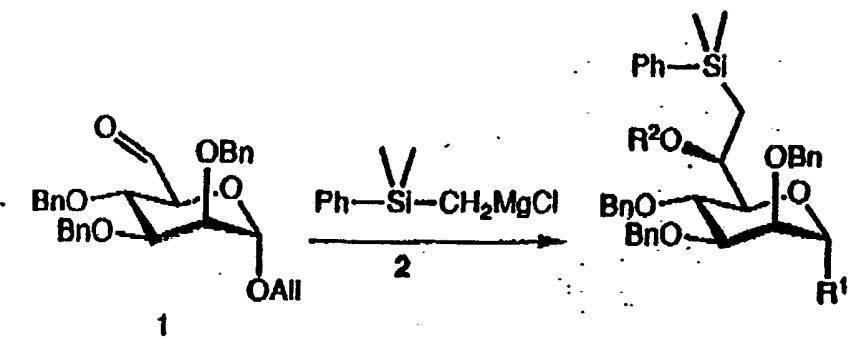
9 1 0 1 3 5 9

FIG. 8

Peptide	MHC restriction
LBV2      T K I S D F G S F I G P R	HLA-DRw15(2)
LBV26     X G G D S N N D V A S Q L Q I F K	HLA-DR3
LBV6      V P R I S Y A H G F D L I E R G K K G	HLA-DR1 AND DR7
EVC38     Y R F G N A V P R I S Y A H G F D F I E	HLA-DRw11(5)
EVC45     N T G I G N Y T Q I N A A S V G L R H K F	HLA-DR1

9101359

FIG. 9a

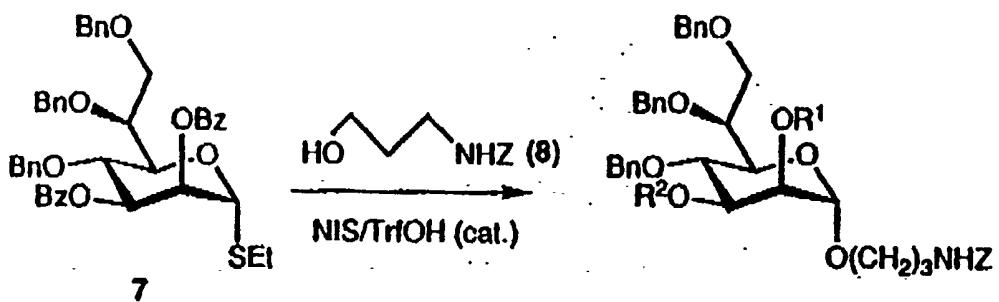


Reagentia en omstandigheden:

- (i)  $BnBr/NaH/n-Bu_4NI/DMF$
- (ii) a)  $Ir(COD)(PMePh_2)_2]PF_6$   
 b)  $HgO/HgCl_2/aceton/water$
- (iii) chloordimethylformidiniumchloride/acetonitriiel/ $CH_2Cl_2$

9 1 0 1 3 5 9

FIG. 9b



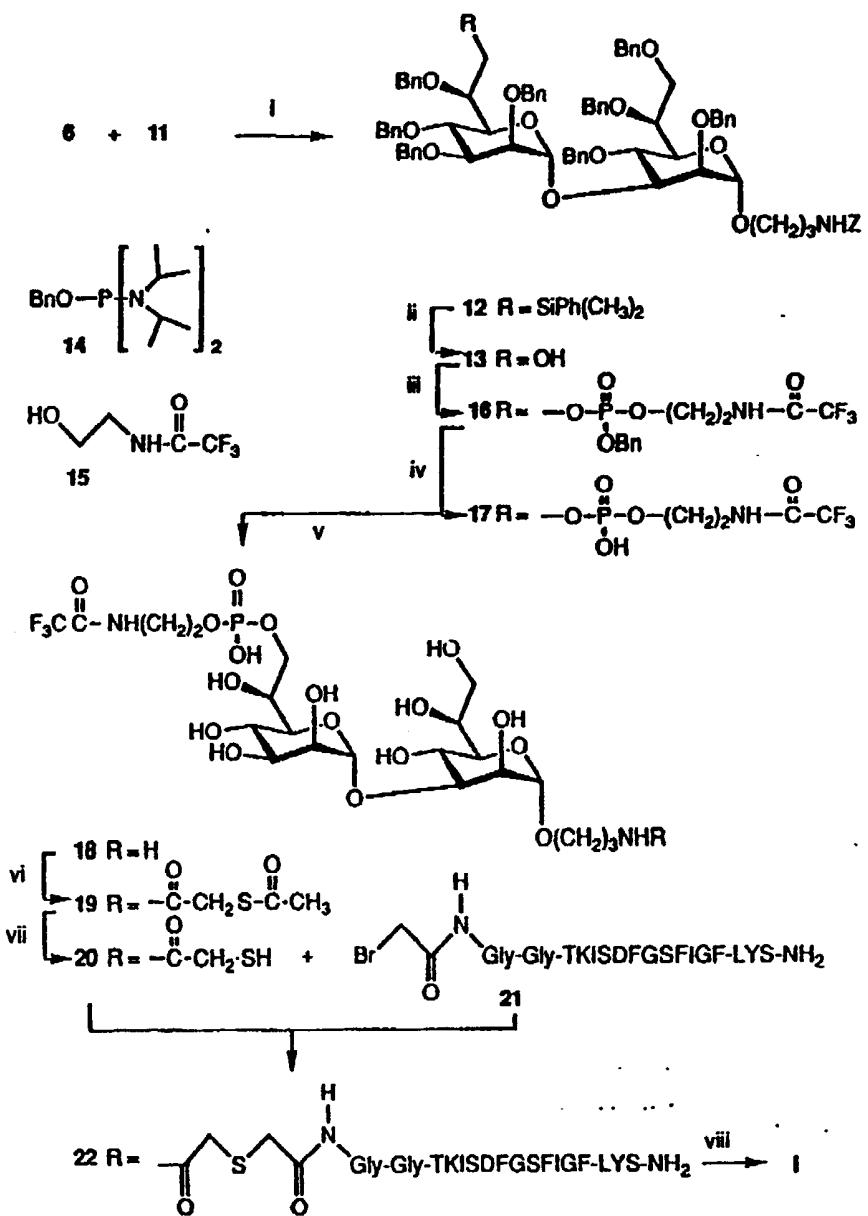
- i  $\square$  9  $R^1 = R^2 = Bz$
- ii  $\square$  10  $R^1 = R^2 = H$
- iii  $\square$  11  $R^1 = Bn, R^2 = H$

Reagentia en omstandigheden:

- (i)  $NaOMe/MeOH$
- (ii)  $NaOH/H_2O, CH_2Cl_2, n-Bu_4NI, BnBr$

9 1 0 1 3 5 9

FIG. 9c



Reagentia en omstandigheden:

- (i) AgOTrf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 18 uur
- (ii) NaBr, HOOAc in AcOH/NaAc, 1,5 uur
- (iii) a) 13/14/1-H-tetrazool  
b) 15/1-H-tetrazool  
c) t-BuOOH
- (iv) 10 eq. NaI/aceton, 18 uur
- (v) Pd/C, H<sub>2</sub>, MeOH
- (vi) pentafluorfenyl-S-acetylmercaptoacetaat in 0,1M fosfaatbuffer (pH 7,8), 1 uur
- (vii) H<sub>2</sub>NOH HCl in fosfaatbuffer (pH 7,2), 18 uur
- (viii) NH<sub>4</sub>OH (25%), 1 uur

9 1 0 1 3 5 9